

Ефект на торфените съставки върху структурната стабилност на белтъци и антихемолитичната резистентност на еритроцити

Иван Т. Иванов*, Пламен Загорчев**

*Тракийски университет, Стара Загора

**Медицински университет, Пловдив

*E-mail: vanov_it@gbg.bg

Effect of Humic Substances on the Structural Stability of Proteins and Resistance of Erythrocytes Against Autohemolysis

I. T. Ivanov*, P. Zagorchev*

*Thracian University, Stara Zagora, Bulgaria

**Medical University, Plovdiv, Bulgaria

Abstract

Peat and peat extracts are extensively studied for their therapeutic effects. Water solution of peat (WTE) and four peat ingredients, humic acid (HA), fulvic acid (FA), uvic acid (UA), and a fraction (NaP) obtained through extraction with Na phosphate, were used in this study. Their effects on the autohemolysis of human erythrocytes and on the structural stability of fibrinogen, represented by its temperature, t_d , and enthalpy, ΔH , of denaturation, determined through UV-spectroscopy were compared. All peat ingredients reduced ΔH , the reductions ranked their ability to bind the protein in the order: FA, WTE > UA >> HA > NaP. FA and HA accelerated autohemolysis while UA, NaP and WTE expressed beneficial impact on the erythrocyte membrane inhibiting autohemolysis.

Key words: humic substances; autohemolytic resistance; protein stability.

Хуминовите вещества се образуват при непълно разлагане на биоматериал (Stevenson, 1994; Ghabbour and Davies, 2000) и се подразделят на хуминови киселини (HA), фулвокиселини (FA) и хумин. В ниско солеви среди и при ниски концентрации, молекулите на HA и FA са гъвкави линейни колоиди. С нарастването на концентрацията и йонната сила, HA и FA придобиват спирално навита конфигурация, подобна на тази при незаредените полимери и твърди сфероколоиди. Молекулите на HA могат да съдържат частици, способни на агрегация и разпадане, с мол. маса от 1000 до 50, 000 Da McDonald et al., 2004). Молекулната маса на FA е приблизително от 1,000 до 10,000.

HA е полидисперсна смес от полимери, чийто странични вериги са от алифатен и ароматен вид. Техните главни функционални групи, определящи техния повърхностен заряд и реактивоспособност са фенолни, карбоксилни и хидроксилни (Stevenson, 1994; Hertkorn et al., 2002). HA се държи като повърхностно-активно вещество, способно да се адсорбира върху хидрофилни и хидрофобни повърхности.

FA е органичен електролит, пренасящ електричен ток (Jackson, 1993) и променящ електричния потенциал на клетките. FA подпомага електрохимичния баланс, взема участие в окислително-редукционни реакции с преходните метали и се изявява като уловител на свободни радикали. HA и FA формират разтворими комплекси с моновалентни, двувалентни и поливалентни метални йони. В сравнение с HA, FA съдържа повече функционални групи с кисел характер, най-вече COOH.

HA и FA са важни съставки на почвата, които влияят на водозадържането, повишават способността за обмяна на катиони и служат като хранителен резерв за живите организми (Schnitzer, 1967). HA повишава проницаемостта на клетъчните мембрани (Christman and Gjessing, 1983; Prakash, 1971), като с това подпомага поемането на хранителни вещества и растежа (Senn and Kingman, 1973). Този ефект е избирателен, проницаемостта за K^+ може да нарасне до два порядъка, а тази за Na^+ само с един порядък.

HA проявява терапевтични ефекти, включително антиоксидантен, антиязвен, радиозаци-

тен, противовъзпалителен (Klocking, 1994). Хуминовите екстракти, по-специално FA, действат като мощен антиоксидантен и хелаторен агент (Scenecsi, 1990). FA предотвратяват и понижават свободнорадикаловата увреда на панкреатичните клетки, която се приема като причина за диабет (Bhattacharya, 1995). HA активира фагоцитите, абсорбира стомашните токсини, стабилизира стомашната микрофлора, изгражда защитен слой върху стомашната мукоза, разстройва метаболизма на патогенните микроби (Ziechman, 1996). Торфът се използва като хранителна добавка за домашните животни (Trckova et al., 2005; Ji et al., 2006). Продължителното приемане от хора на HA чрез питейната вода може да причини гангрена по краката, съчетана с увреждане на периферните кръвоносни пътища и втресъдова хемолитиза (Cheng et al., 1999). HA генерира оксидативен стрес, съчетан с увреда и апоптоза на фибробластите (Cheng et al., 2003).

Началният етап от въздействието на хуминовите субстанции включва адсорбция върху различни повърхности. Взаимодействието на HA с протеини е силно при кисело рН и много слабо при алкално рН (De Nobili et al., 2001). Други автори (Mouga et al., 2007) докладват силна рН-зависима адсорбция на HA и FA върху бактериални стени и хидрофобни повърхности.

Настоящата статия имаше за цел да се проведе сравнително изследване при физиологично рН на взаимодействието на торфени извлеци с мембраната на човешки еритроцити и с фибриноген от човек, който е глобуларен белтък, вземащ участие в кръвосъсирването.

Материал и методи

Изолиране на отделните фракции хуминови вещества. За изолирането на главните фракции, HA и FA, органичната част на торфа беше разтворена в 0,1 N NaOH (Beer et al., 2000; Lowe, 1992; Aiken et al., 1992). След подкисляване на разтвора до рН 2, HA образува утайка, която се отделя чрез центрофугиране, диализира се и изсушава се. FA се изолира от супернатанта чрез колонна хроматография. Общо 5 фракции бяха изолирани, чийто обозначения и изходни концентрации, определени по метода на изсушаването, са HA (42 g/l), FA (21 g/l), WTE (воден разтвор на торф, 4 g/l), NaP (фракция получена чрез екстракция с Na phosphate, 24 g/l) и UA (увинова киселина, 9 g/l).

УВ-спектроскопия. Термичната денатурация на фибриноген беше проследявана чрез УВ-спектрофотометър (Milton Roy Spectronic 21D, USA), снабден с електрически подгреваем кюветодържател (Poklar et al., 1999). За целта бяха използ-

вани три разтвора: посоченият разтвор на хуминов екстракт, прясно приготвен изходен разтвор на фибриноген (10 mg/ml) и добре деаериран (100 °C, 5 min) работен разтвор от 130 mM NaCl и 20 mM phosphate buffer, рН 7,4. Преди всеки експеримент порция (0 – 200 µl) от разтвора на хуминов екстракт се добавя към 2,8 ml от работния разтвор и оптичната пропускливост при 230 nm (T_{230}) на получения разтвор се настройва на 100%. Към фотометрирания разтвор се добавят 80 µl от изходния разтвор на фибриноген, с което T_{230} се понижават до около 45% при крайна концентрация на белтък 0,029 тегл. %. Температурата t °C на разтвора се измерва с електронен термометър (0,1 °C точност). Изходните аналогови сигнали на спектрофотометъра и термометъра се подават на компютър през аналого-цифров преобразувател.

Разтворът се загрява със скорост 2 °C/min от 20 до 70 °C. При достигане на температурата на полупреход t_d , половината от молекулите на белтъка са денатурирани. Получената зависимост $T_{230} - t$ °C (за пример – фиг. 1) позволява да се определят няколко важни термодинамични параметъра – температурата на денатурация (t_d) и енталпията на денатурация (ΔH°) по van't Hoff. Най-напред се получава т. нар. денатурационна крива, това е зависимостта на степента на денатурация f_D от температурата t . За целта от измереното при всяка температура оптично пропускане T_{230} се изчислява f_D по формулата

$$f_D = \frac{T_{230}^N - T_{230}(t)}{T_{230}^N - T_{230}^D} \quad (1)$$

където N и D се отнасят до началното (нативно) и крайното (денатурирано) състояние. Накрая ΔH се изчислява по формулата (Marky and Breslauer, 1987):

$$(\Delta H_{vH}^\circ) = 4.R.(t_d)^2 \left(\frac{\partial f_D}{\partial t} \right)_{t=t_d} \quad (2)$$

В последната формула изразът $\partial f_D / \partial t$ представлява наклона на денатурационната крива в температурата на полупреход (t_d) (за пример – фиг. 2).

Автохемолитичен тест. Ефектът на торфените извлеци върху хемолитизата на човешки еритроцити, предизвикана от метаболитно изтощение (автохемолитиза), беше изучено при стерилни условия. Еритроцитите се отделяха от свежа хепаринизирана кръв чрез центрофугиране (5000 об/мин, 5 min) и се промиваха трикратно в разтвор от 150 mM NaCl. Изследваната еритроцитна суспензия се получава, като към 2 ml среда, съдържаща 110 mM NaCl, 40 mM фосфатен буфер с рН = 7,4, 0,3 mM NaN_3 и 0,5 mg/ml стрептомицин се

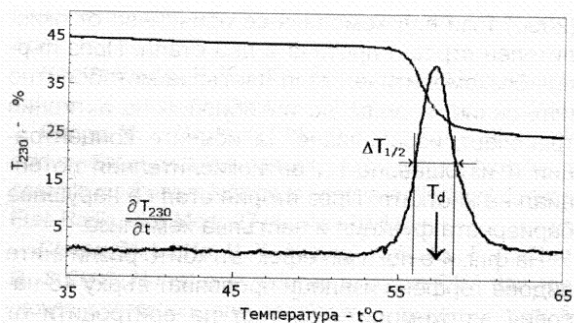
добавят 80 μl от посочения хуминов екстракт и 0,2 ml пакетирани еритроцити (хематокрит 7%). Контролната суспензия се приготвя по същия начин, но без хуминов екстракт. Изпитваната и контролната суспензия се държат в кювети при стайна температура (23 $^{\circ}\text{C}$). В определени моменти кюветите се центрофугират (5000 об/мин, 5 min). Хемолизата се определя, като от получения супернатант се отделя 100 μl , разрежда се до 1,5 ml dH_2O и се измерва екстинцията при 555 nm срещу dH_2O . В края на теста 20 mg сапонин-S се добавят за да се предизвика пълна хемолиза, която служи за сравнение.

Резултати и обсъждане

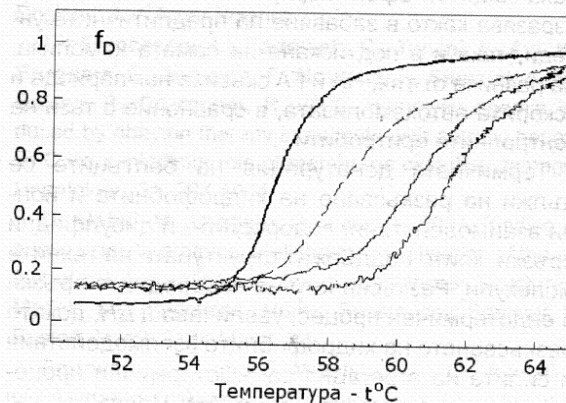
Температурата на термична денатурация t_d и енталпията ΔH на денатурация на фибриногена са количествени параметри, които описват неговата структурна стабилност. Тяхната промяна в присъствие на хуминовите екстракти е мярка за ефекта, който тези екстракти упражняват върху белтъка.

Интегралната крива на фиг. 1 показва температурно-индуцираната денатурация на фибриноген. Диференциалната крива под нея отговаря на скоростта на денатурация и посочва температурата на денатурация t_d и полуширината $\Delta T_{1/2}$ на пика, описващ денатурацията. Около t_d пропускливостта рязко спада като следствие от разгъване на полипептидната верига на белтъка и промяната (обикновено намаление) на неговия моларен обем. При тези условия t_d на фибриногена е 57,5 $^{\circ}\text{C}$, което е близко до стойността 60,5 $^{\circ}\text{C}$, определена от Donovan and Mihalyi (1974), а ΔH е 460 kcal/mol.

Денатурационните криви на фибриноген в присъствие на различни концентрации на UA бяха пресметнати по формула (1) и са показани на фиг. 2. За да се постигне равновесно свързване на екстракта с белтъка, преди загряването белтъчният разтвор беше разбъркван в продължение на 20 min при стайна температура (De Nobili et al., 2001). С нарастване на концентрацията на UA t_d слабо се увеличи до 1,5 $^{\circ}\text{C}$ при концентрация на UA от 128 $\mu\text{g/ml}$ (табл. 1). В същото време $\Delta T_{1/2}$ се увеличи значително (не е показано). Стойностите на ΔH , получени при различните концентрации на UA са показани на фиг. 3. Останалите хуминови екстракти – WTE, FA, NaP и HA също понижиха ΔH , като показаха различна зависимост от концентрацията (фиг. 3). Като цяло UA, FA и NaP произведоха статистически значимо повишение на t_d , при HA този ефект беше слаб, а при WTE се наблюдаваше понижение на t_d (табл. 1). Относителната грешка в определянето на ΔH е $\pm 10\%$.



Фиг. 1. Термична денатурация на фибриноген при pH 7,4
Fig. 1. Thermal denaturation of fibrinogen at pH 7.4



Фиг. 2. Температурна зависимост на степента f_D на денатурация на фибриноген в присъствие на UA
Fig. 2. Temperature dependence of the extent of denaturation of fibrinogen, f_D , in the presence of UA
0 – контрол/control, 1 - 32 $\mu\text{g/ml}$, 2 - 64 $\mu\text{g/ml}$, 3 - 128 $\mu\text{g/ml}$

Таблица 1. Температура на денатурация t_d на фибриноген в присъствие на хуминови екстракти
Table 1. Temperature of denaturation, t_d , of fibrinogen as affected by the presence of humic substances

Хуминов екстракт	t_d ($^{\circ}\text{C}$) при максимална концентрация на екстракта	Δt_d ($^{\circ}\text{C}$) спрямо контролата
Контрола	57,5*	0
WTE	57,2	-0,3
HA	58,0	+0,5
UA	59,1	+1,6
FA	58,9	+1,4
NaP	58,5	+1,0

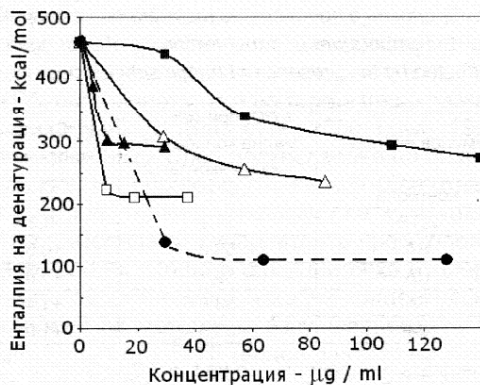
* - грешката в определянето на t_d е $\pm 0,1$ $^{\circ}\text{C}$.

Ефектът на хуминовите екстракти на клетъчно ниво беше изследван чрез влиянието им върху автохемолизата на еритроцити. Автохемолизата настъпва, когато изолирани еритроцити се поставят в среда, лишена от хранителни съставки. Съгласно Wang et al. (1996), De Franceschi et al.

(2000) този вид хемолиза се причинява от окислителен стрес и протича в два етапа. През първия безхемолитичен етап настъпва метаболитно изтощение, водещо до инхибиране на активния транспорт, изравняване на йонните концентрации и изтощаване на антиокислителния потенциал на клетките. През втория етап се нарушава бариерната функция и настъпва хемолиза.

На фиг. 4 е показан ефектът, който различните видове торфени извлеци проявяват върху 48-часовия автохемолитичен тест на еритроцити от човек. В сравнение с контролните клетки, някои екстракти (NaP, WTE и особено UA) демонстрираха защитен ефект върху клетките. Ефектът се изразява както в забавяне на предлитичните увреди, така и в подтискане на самата хемолиза. За разлика от тях, HA и FA скъсиха лаг-периода и ускориха автохемолизата, в сравнение с тази на контролните еритроцити.

Термичната денатурация на белтъците се дължи на разкъсване на хидрофобните и йонни взаимодействия, водородните и дисулфидни връзки, които поддържат структурата на техните молекули. Разкъсването на водородните връзки е ендотермичен процес, увеличаващ ΔH , докато разкъсването на хидрофобните взаимодействия и силите на агрегация са екзотермични процеси, водещи до намаление на ΔH (Harwalkar and Ma, 1987). Колкото повече участъци с подредена вторична структура и по-малко неподредени сегменти присъстват в белтъка, толкова промяната в енталпията ΔH ще бъде по-голяма (Arntfield and Murray, 1981). Понижението на ΔH след външно въздействие се тълкува като поява



Фиг. 3. Понижение на енталпията на денатурация ΔH на фибриноген в присъствие на хуминови екстракти.
Fig. 3. Reduction in the enthalpy of denaturation ΔH of fibrinogen obtained at the presence of various humic substances

■ – NaP; □ – FA; ● – UA; ▲ – WTE; Δ – HA

на различни от нативното междинни състояния с по-лабилна структура, които приближават конформацията на белтъка към крайната денатурирана форма.

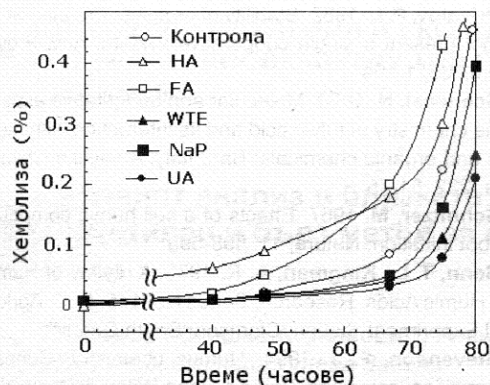
В присъствие на хуминови екстракти ΔH на фибриноген значително се понижава. В същото време се увеличи и полуширината $\Delta T_{1/2}$ на пика, която е мярка за кооперативността на прехода от нативно в денатурирано състояние (Privalov, 1982). Това намаление на ΔH и на кооперативността на денатурация показва отслабване и разкъсване на част от вътремолекулните връзки и поява на нови връзки, вследствие на взаимодействието на белтъчната глобула с хуминовите екстракти.

На основа на горните разсъждения и данните, показани на фиг. 3, можем да заключим, че взаимодействието хуминов екстракт – белтък значително намалява броя на водородните връзки и увеличава хидрофобните взаимодействия, а така също понижава подредеността в белтъчната молекула. Много показателен е резултатът, че за разлика от значителното понижаване на ΔH , хуминовите екстракти слабо променяха t_d , т. е., тяхното проникване вътре в белтъчната глобула е незначително. Това показва, че взаимодействието хуминов екстракт – белтък се осъществява главно по повърхността на белтъчната молекула. От тук можем да предположим, че понижението на ΔH е следствие главно на отстраняването на част от повърхностно-свързаната към белтъка вода и заместването ѝ с молекули на екстракта.

Фигура 3 показва, че концентрационната зависимост на ефекта на някои екстракти (FA, WTE) върху ΔH има вид на насищане – при ниски концентрации ефектът е силен, а при високи концентрации ефектът остава постоянен. Това показва, че различните екстракти имат силно различаваща се способност да се свързват с повърхността на белтъчната глобула и да насищат нейните свързващи центрове, което може да се обясни с тяхното различно съдържание на полиацидни и полифенолни групи. Съгласно определената по този начин способност да се свързват към белтък, използваните екстракти могат да бъдат подредени в реда FA, WTE > UA >> HA > NaP. Този резултат се съгласува с факта, че FA действа като мощен хелаторен агент (Sceneci, 1990).

Използваните хуминови екстракти имат умерено голяма молекулна маса (средно 1500 Da). Те могат да се разглеждат като мембрано-непроницаеми и взаимодействащи само с външната страна на клетъчните мембрани, в частност с мембранните белтъци, експонирани по тази повърхност.

Ускоряването на автохемолизата в присъствие HA (фиг. 4) се съгласува с данните, че HA пови-



Фиг. 4. Ефект на различни торфени извлекци върху автохемелизата на еритроцитите от човек

Fig. 4. Time course of autohemolysis of human erythrocytes as affected by the peat extracts indicated

■ – NaP; □ – FA; ● – UA; ▲ – WTE; Δ – HA

шава проницаемостта на клетъчните мембрани и генерира окислителен стрес, водещ до хемелиза на еритроцитите (Hseu and Yang, 2002) и до апоптоза на фибробластите (Cheng et al., 2003). Механизмът, по който FA ускорява автохемелизата вероятно е различен от този на HA и може да се подпомага от голямата му способност да се свързва към белтъци (фиг. 3), следователно и към плазматични мембрани. Тъй като FA е силен електролит, това може да промени електричния заряд на мембраната, нарушавайки някои мембранни функции, в частност бариерната функция. Влияние може да оказва и ролята на FA като донор и акцептор на електрони, което може да ускори окислителния стрес върху клетъчните мембрани.

Заклучение

UA, NaP и WTE, за разлика от FA и HA, проявиха защитен ефект върху еритроцитната мембрана и увеличиха t_D на пробния белтък. Това показва, че те могат да имат лечебно действие при някои заболявания, свързани с възпалителни и автоокислителни процеси.

Литература

- Aiken, G. A., McKnight, D. M., Thorn, K. A., Thurman, E. M. 1992. Isolation of hydrophilic organic acids from water using nonionic macroporous resins. *Org. Geochem.*, 18, 567-573
- Arntfield, S. D., Murray, E. D. 1981. The influence of processing parameters on food protein functionality I. Differential scanning calorimetry as an indicator of protein denaturation. *J. Can. Inst. Food Sci. Tech.*, 14, 289-294
- Beer, A.-M., Lukanov, Y., Zagorchev, P. 2000. The influence of fulvic and ulmic acids from peat on the sponta-

neous contractile activity of smooth muscles. *Phytomedicine*, 7(5), 407-415

Bhattacharya, S. K. 1995. Activity of shilajit on alloxan-induced hyperglycemia in rats. *Fitoterapia*, 66 (4), 328-332

Cheng, M. L., Ho, H. Y., Chiu, D. T., Lu, F. J. 1999. Humic acid-mediated oxidative damages to human erythrocytes: a possible mechanism leading to anemia in Blackfoot disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 27 (3-4), 470-477

Cheng, M. L., Ho, H. Y., Huang, Y. W., Lu, F. J., Chiu, D. T. 2003. Humic acid induces oxidative DNA damage, growth retardation, and apoptosis in human primary fibroblasts. *Exp. Biol. Med.*, 228 (4), 413-423

Christman, R. F., Gjessing, E. T. 1983. Aquatic and terrestrial humic materials. The Butterworth Grove, Kent, England: Ann Arbor Science.

De Franceschi, L., Fattovich, G., Turrini, F., Ayi, K., Brugnara, C., Manzato, F., Noventa, F., Stanzial, A. M., Solero, P., Corrocher, R. 2000. Hemolytic anemia induced by ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection: role of membrane oxidative damage. *Hepatology*, 31, 997-1004

De Nobili, M., Bragato, G., Leita, L. 2001. Binding of humic acids to proteins: preliminary investigation of the effect of pH. *Proceedings of Humic Substances: Structures, Models and Functions. Humic Substances Seminar V*, Boston, March 21 to March 23.

Donovan, J. W. and E. Mihalyi. 1974. Conformation of Fibrinogen: Calorimetric Evidence for a Three-Nodular Structure. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. Vol. 71, No. 10, p. 4125-4128

Ghabbour, E. A., Davies, G. (eds). *Humic Substances: Versatile Components of Plants, Soils and Water*; Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2000.

Harwalkar, V. R., Ma, C.-Y. 1987. Study of thermal properties of oat globulin by differential scanning calorimetry. *J. Food Sci.*, 52, 394-398

Hertkorn, N., Permin, A., Perminova, I., Kovalevskii, D., Yudov, M., Petrosyan, V., Kettrup, A. 2002. Comparative Analysis of Partial Structures of a Peat Humic and Fulvic Acid Using One- and Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Environ. Qual.*, 31, 375-387

Hseu, Y. C., Yang, H. L. 2002. The effects of humic acid-arsenate complexes on human red blood cells. *Environ. Res.*, 89 (2), 131-137

Jackson, W. R. 1993. *Humic, Fulvic and Microbial Balance: Organic Soil Conditioning* 329. Evergreen, Colorado: Jackson Research Center.

Ji, F., McGlone, J. J., Kim, S. W. 2006. Effects of dietary humic substances on pig growth performance, carcass characteristics, and ammonia emission. *J. Anim. Sci.*, 84, 2482-2490

Klocking, R. 1994. Humic substances as potential therapeutics. –In: Senesi, N., Miano, T. M.; *Humic substances in the global environment and implications on human health: proceedings of the 6th international meeting*

of the International Humic Substances Society, Monopoli, Italy; September 20-25, 1992; Elsevier: Amsterdam.

Lowe, L. E. 1992. Studies on the nature of sulfur in peat humic acids from the Fraser River delta, British Columbia. *Sci. Total Environ.*, 113, 133-145

Marky, L. A., Breslauer, K. J. 1987. Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves. *Biopolymers*, 26: 1601-1620

McDonald, S., Bishop, A. G., Prenzler, P. D., Robards, K. 2004. Analytical chemistry of freshwater humic substances. *Analytica Chimica Acta*, 527, 105-124

Moura, M. N., Martin, M. J., Burguillo, F. J. 2007. A comparative study of the adsorption of humic acid, fulvic acid and phenol onto *Bacillus subtilis* and activated sludge. *J. Hazard. Mater.*, 149 (1), 42-48

Poklar, N., N., Petrovčič, M. Oblak and G. Vesnaver. 1999. Thermodynamic stability of ribonuclease A in alkylurea solutions and preferential solvation changes accompanying its thermal denaturation: A calorimetric and spectroscopic study. *Protein Science*, 8: 832-840

Prakash, A. 1971. Terrigenous organic matter and coastal phytoplankton fertility. - In: J. D. Costlow (Ed.), *Fertility of the sea*, 2. Proceedings of an International Symposium on Fertility of the Sea, Sao Paulo, Brazil, London and New York: Gordon and Breach Science, p. 351-368

Privalov, P. L. 1982. Stability of proteins: Proteins which do not present a single cooperative system. *Adv. Protein Chem.*, 35, 1-104

Scenecsi, N. 1990. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interaction with metal ions and organic chemicals: Bari, Italy. *Analytica Chimica Acta*, 232, 51-75

Schnitzer, M. 1967. Effects of a soil humic compound on root initiation. *Nature*, 11, 598-599

Senn, T. L., Kingman, A. R. 1973. A review of Humus and Humic Acids. Research, Series No. 145, S. C. Agricultural Experiment Station, Clemson, South Carolina.

Stevenson, F. J. 1994. *Humus chemistry. Genesis, composition, reactions.* 2nd ed. John Wiley & Sons, New York.

Trckova, M., Matlova, L., Hudcova, H., Faldyna, M., Zraly, Z., Dvorska, L., Beran, V., Pavlik, I. 2005. Peat as a feed supplement for animals: a review. *Vet. Med. - Czech*: 50(8): 361-377

Wang, J., Huang, C. J., Chow, C. K. 1996. Red cell vitamin E and oxidative damage: a dual role of reducing agents. *Free Radic. Res.*, 24(4), 291-298

Ziechmann, W. 1996. Humic substances and their Medical Effectiveness. 10th International Peat Congress, Vol. 2. Stuttgart, p. 546-554